

酸枣组培快繁的影响因素

代丽¹, 王玖瑞², 刘孟军¹, 赵锦³,
周俊义¹, 刘晓光¹, 刘彩霞¹

(1. 河北农业大学 中国枣研究中心, 河北 保定 071001;

2. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071001; 3. 河北农业大学 生命学院, 河北 保定 071001)

摘要: 试验研究了酸枣组培快繁体系优化过程中的影响因素, 结果表明: 休眠期水培新梢是酸枣快繁启动培养的适宜外植体, 应采用 70% C₂H₅OH + 0.1% HgCl₂ 浸泡 6~8 min 的方法进行表面消毒; 增殖培养以 20 d 或 30 d 为一个继代周期为宜; 暗培养 10 d 可以显著促进试管苗生根, 而基部刻伤对试管苗生根率和生根条数无明显影响。

关键词: 酸枣 (*Ziziphus acidojubus*); 组培; 快繁; 影响因素

中图分类号: S 665.1

文献标识码: A

Study on factors effecting micropropagation in wild jujube (*Ziziphus acidojubus*)

DAI Li¹, WANG Jiu-ru², LIU Meng-jun¹, ZHAO Jin³,
ZHOU Jun-yi¹, LIU Xiao-guang¹, LIU Cai-xia¹

(1. Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

3. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Factors influencing micropropagation were optimized for wild jujube (*Ziziphus acidojubus* C. Y. Cheng et M. J. Liu). The new shoots from dormancy branch stem cultured in water were ideal explants during initiation culture. Explants could be rinsed with 70% C₂H₅OH for 30 sec and then with 0.1% HgCl₂ for 6-8 min to establish sterilized system. Subculture period was 20 or 30 d during efficient proliferation. While the growth of roots was obviously accelerated by dark culture for 10 d, the rooting rate and amount of roots every shoot were not efficiently influenced by wound at shoot base.

Key words: wild jujube; tissue culture; micropropagation; factors

酸枣 (*Ziziphus acidojubus* C. Y. Cheng et M. J. Liu) 原产我国, 是栽培枣 (*Z. jujuba* Mill.) 的优良砧木, 也是我国重点管理中药材。通过组培快繁

优异种质, 是达到产业化栽培生产的必由之路。在已有酸枣组培快繁研究中, 已经实现了植株再生^[1-4], 为长期以来一直处于野生状态酸枣的高效

收稿日期: 2006-03-01

基金项目: 国家科技攻关计划 2001BA502B09-04; 国家发改委项目; 河北农业大学“9816”重大科技工程项目资助

作者简介: 代丽 (1972-), 女, 河北肃宁人, 硕士, 主要从事干果种质资源与分子生物技术育种研究。

通讯作者: 刘孟军 (1965-), 男, 河北望都人, 博士, 教授, 从事干果种质资源与分子辅助育种研究。

优质栽培奠定了初步基础。但酸枣的快繁技术体系有待进一步优化,以提高繁殖效率和进行标准化生产。试验针对无菌培养体系的初步建立到诱导生根过程的几个影响因素进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以河北农业大学中国枣研究中心酸枣种质资源圃内优选酸枣和组培室内优选酸枣组培苗为试材。

1.2 方 法

(1)取休眠期5号酸枣一年生枝条带回室内水培(枝条底部浸在洁净的自来水中,每2d换一次水,4d时截去枝条底部0.5cm),待休眠芽萌发出约1.0cm新梢后,剪下,用水冲洗干净,接种于附加有不同BA、IBA浓度的MS启动培养基上。生长期从田间采集外植体,消毒后接种于培养基上。每处理接种材料30个以上,生长15d后,比较外植体的不同采样时期和不同消毒方法对启动培养的影响,30d后比较外植体类型和生长调节剂对启动培养的影响。

(2)以1号和4号酸枣继代6~8次组培苗为试材,将达到一定生长量的材料切成双芽茎段接种于MS+BA2.0mg/L的继代培养基上,比较不同培养天数(10、20、30和40d)的增殖结果。

本实验室计算增殖系数方法为:增殖系数=能获得的双芽茎段数/接种时的双芽茎段数。

(3)使用IBA浓度0.5mg/L的1/2MS培养基,培养达到一定生长量(2.5cm左右)的无根苗。进行暗培养5、10、15d后取出至光下培养。每次间隔5d观察统计一次。比较不同光照处理对试管苗生根的影响。在基部茎段上刻伤接入,接好后先暗培养10d,然后置于光下培养。30d时统计生根情况。比较创伤对生根的影响。

启动和继代繁殖所用基本培养基为MS,蔗糖30g/L,琼脂3.5g/L。生根培养基为1/2MS培养基,所有营养元素减半,蔗糖20g/L,琼脂3.5g/L。pH5.8,培养温度25~28℃,光照周期为14h光/10h暗,光照强度1500lx。

2 结果与分析

2.1 消毒方法和外植体采样时期对启动培养的影响

通过对休眠期水培获得的外植体进行不同消毒时间的试验表明,用70% C_2H_5OH +0.1% $HgCl_2$ 消

毒6min和8min,成活率可达到83.3%、88.3%,与消毒4min的处理相比较成活率差异显著(表1)。

表1 休眠期消毒方法对启动培养的影响

Table 1 Effects of sterilizing method during dormancy period on initiation culture

消毒剂 Disinfectant	时间/min Time	成活率/% Living rate
70% C_2H_5OH +0.1% $HgCl_2$	4	65.6 b
	6	88.3 a
	8	83.3 a

生长初期使用不同的消毒方法时,70% C_2H_5OH +0.1% $HgCl_2$ 消毒8min的处理与2% $NaClO$ 处理10min的处理结果差异显著,与其它处理差异不显著,综合比较以70% C_2H_5OH +0.1% $HgCl_2$ 消毒8min启动培养的成活率最高,2% $NaClO$ 最差(表2)。

表2 生长初期消毒方法对启动培养的影响

Table 2 Effects of sterilizing method during beginning of growing period on initiation culture

消毒剂 Disinfectant	时间/min Time	成活率/% Living rate
70% C_2H_5OH +0.1% $HgCl_2$	6	47.2 ab
	8	60.0 a
	10	39.7 b
2% $NaClO$	15	43.9 ab
	20	50.0 ab
0.1% $HgCl_2$ +0.1% $HgCl_2$ *	4+4	51.7 ab

在生长旺盛期,使用两种消毒方法,不同消毒时间对外植体进行处理,四种处理之间结果表现明显差异,以70% C_2H_5OH +0.1% $HgCl_2$ 消毒8min的处理启动成活率最高,达到32.5%(表3)。

表3 生长旺盛期消毒方法对启动培养的影响

Table 3 Effects of sterilizing method during fast-growing period on initiation culture

消毒剂 Disinfectant	时间/min Time	成活率/% Living rate
70% C_2H_5OH +0.1% $HgCl_2$	6	7.5 d
	8	32.5 b
	10	18.8 c
0.1% $HgCl_2$ +0.1% $HgCl_2$	4+4	37.5 a

2.2 外植体和生长调节剂对启动培养的影响

不同的外植体(枣头茎尖、枣吊尖、二次枝茎尖和水培新梢茎尖)在启动培养时新生主茎平均长度存在差异(表4)。其中,以水培萌发获得的新梢为试材时,培养效果最好,新生主茎平均长度达到3.5cm,据观察枣头茎顶端黄化程度明显轻于枣吊尖

和 2 次枝茎尖。综合比较,以水培萌发获得的新梢茎尖为外植体,采用 MS+BA1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L 培养基进行启动培养为宜。

表 4 外植体和生长调节剂对启动培养的影响

Table 4 Effects of different explants and regulators on initiation culture

外植体 Explants	培养基/(mg·L ⁻¹) Medium	30 d 后新生主茎 平均高度/cm
		Average height of new main shoot 30 days later
枣头茎尖	MS+BA0.5+NAA0.1	2.0
	MS+BA1.0+NAA0.1	2.5
	MS+BA2.0+NAA0.1	1.7
枣吊尖	MS+BA0.5+NAA0.1	2.3
	MS+BA1.0+NAA0.1	2.5
	MS+BA2.0+NAA0.1	2.2
二次枝茎尖	MS+BA0.5+NAA0.1	1.8
	MS+BA1.0+NAA0.1	2.2
	MS+BA2.0+NAA0.1	2.0
水培新梢茎尖	MS+BA0.5+NAA0.1	2.0
	MS+BA1.0+NAA0.1	3.5
	MS+BA2.0+NAA0.1	2.6

2.3 继代时间和基因型对增殖的影响

1 号酸枣采用不同继代时间时,继代 30 d 和 40 d 的增殖系数差异不显著(表 5),但对于工厂化育苗来讲,应考虑年增殖系数,继代时间为 30 d 的理论年增殖系数(3.38×10^6)是 40 d(7.88×10^4)的 41.89 倍。而 4 号酸枣虽然继代时间为 30 d 和 40 d 的增殖系数差异不显著,与继代时间为 20 d 增殖系

数差异表现显著,当继代时间为 20 d 时,理论年增殖系数达到 1.46×10^7 ,是 30 d(理论年增殖系数为 1.15×10^6)和 40 d(理论年增殖系数为 6.07×10^6)的 11.70 倍和 239.53 倍。

由以上分析可以看出:工厂化育苗时,酸枣 1 号的继代时间以 30 d 为宜,酸枣 4 号的继代时间以 20 d 为宜,不同的基因型因其最适继代时间不同,所以增殖效果也表现出明显差异。

表 5 继代时间和基因型对增殖的影响

Table 5 Effects of subculture period and genotype on proliferation

继代周期/d Subculture period	增殖系数 Proliferation coefficient	
	酸枣 1 号	酸枣 4 号
10	1.0 c	1.1 c
20	2.1 b	2.5 b
30	3.5 a	3.2 a
40	3.5 a	3.4 a

2.4 光照对生根的影响

光照条件显著影响酸枣组培苗生根(表 6)。暗培养时间过长或过短都不利于出根,以暗培养 10 d 效果最好,在 4 d 时首先出根,30 d 时生根率达到了 88%。在光下直接生长的试管苗生长较慢,且根长较短,而暗培养 15 d 时,不仅生根率下降,而且试管苗出现黄化,节间增长,出现生长不良现象。因此,以暗培养 10 d 促进生根效果最好。

表 6 光照对试管苗生根的影响

Table 6 Effects of light on rooting culture

方法 Method	株数 Amount of shoots	不同培养时间的生根株数 Amount of rooting shoots different days later				生根率/% Rooting rate	平均每株生根数量 Average amount of roots every shoot
		5 d	10 d	15 d	30 d		
光照	50	0	0	23	42	84.00	2.30 b
暗培养 5 d	50	0	0	6	31	62.00	1.88 b
暗培养 10 d	50	0	4	26	44	88.00	2.86 a
暗培养 15 d	50	0	0	13	35	70.00	2.18 b

2.5 刻伤处理对生根的影响

基部刻伤处理与未处理的酸枣试管苗,在生根率和平均生根条数上经统计分析差异不显著。但观察发现,刻伤过的酸枣组培苗的根周围无大块愈伤组织,根长均在 1 cm 以上,个别植株上可生长十几条根,这样的组培苗在出苗清洗时损伤较少,有效的减少了伤根,更有利于植株的移栽成活。

3 讨论

关于组织培养试验中外植体的采集时期问题,许多研究^[3,5]认为,外植体的采集时期以生长旺盛期最好,但本试验结果表明休眠期水培的枣头茎尖处理后不仅染菌率低,且生长最佳。

(下转第 42 页)

测定。由于 ELISA 具有准确、灵敏、快速、特异、经济等特点,在医学、植物学和食品学中得到广泛应用。但由于 ELISA 建立在分子间作用力的基础上,影响其结果的因素很多。为了减小非特异性吸附作用,抗原抗体的工作浓度以及洗板的次数和洗板的时间都应严格控制,一般原则是,抗体和抗原的工作浓度越稀越能减少非特异性吸附作用;洗板时间过短或洗板次数过少,非特异性干扰就大。本试验初步用间接竞争 ELISA 制备了检测 2,4-D 多克隆抗体。绘制标准曲线时应注意样品稀释液及孵育温度和 pH 等工作环境的影响,这样标准曲线才可避免非特异性误差。

参考文献:

- [1] ANNE ZEDLK, ANJA EIKENBERG, MICHAEL G W-ELLER, *et al.* Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine] microcystins[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 441: 1-13.

- [2] 李治祥,王勇,张俊亭. 农药及其它环境污染物的酶免疫素测技术[J]. *国外农业环境保护*, 1992, 3: 6-10.
- [3] 陈新建,陈梅英,赵会杰. 免疫学技术在植物科学中的应用[M]. 北京:中国农业大学出版社,1998. 46-57.
- [4] ERLANGER B F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey[J]. In *Methods of Enzymology*, 1980, 85-104.
- [5] MATTHEWS W A. Immunoassay tests for organophosphorous pesticides in grain and straw cereal products[A]. *Diagnostics in Crop Protection, BCPC Symposium Proceedings*[C]. 1996, 65: 305-310.
- [6] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000. 56.
- [7] VANDERLANN M. Immunoassays for Trace Chemical Analysis: Monitoring Toxic Chemicals in Humans, Food, and the Environment[M]. ACS Washington, DC, 1991. 2-13.

(编辑:梁虹)

(上接第 28 页)

因此认为,生长期材料,带菌多易于污染,且褐化严重,而 12~2 月份的水培新梢,材料本身具备旺盛生长潜力,带菌少,褐化轻,更适合作为酸枣快繁外植体。

基因型是影响快繁的内因,不同基因型之间存在差异^[6-11],这给规模化组织培养带来很大的难度。本试验过程初步观察发现,多种基因型在启动培养后进行一段时间的同化培养,即将不同类型酸枣在相同培养基中进行适应培养,结果大多数类型经过驯化后可以适应相同的培养基,这大大缩短了快繁体系的建立时间,提高了效率,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 邱奉同,吴峰. 酸枣的组织培养和植株再生[J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(2): 129.
- [2] 代丽,刘孟军,王玖瑞,等. 酸枣组培快繁研究[J]. *河北农业大学学报*, 2005, 28(2): 19-22.
- [3] 刘翠云,张小红,马洪明. 酸枣微繁技术的研究[J]. *西*

北植物学报, 1995, 15(4): 301-306.

- [4] 孙清荣,刘庆忠,赵红军. 酸枣的组织培养与快繁[J]. *落叶果树*, 2001(2): 1-2.
- [5] 王震星,刘贵仁,唐桂玲. 金丝小枣茎段离体快繁技术的研究[J]. *落叶果树*, 1996(1): 10-12.
- [6] 李云,王宇,田砚亭. 赞皇大枣的组织培养[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 37(5): 424.
- [7] 朱文勇,杜学梅,郭黄萍. 梨枣组织培养快繁技术研究[J]. *中国农学通报*, 2001, 17(4): 34-36.
- [8] 尚成海,田翠杰,窦炳升. 苹果枣组培快繁技术研究[J]. *河北果树*, 2000(2): 12-13.
- [9] 陈江. 鸣山大枣离体培养的研究[J]. *甘肃林业科技*, 1992(2): 8-10.
- [10] 张福泉,王嘉长,金芳. 6BA, IBA 和 IAA 对鸣山大枣试管苗继代繁殖的效应[J]. *甘肃农业大学学报*, 1995, 31(4): 259-292.
- [11] 王玉珍. 冬枣茎尖离体培养成苗[J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32(1): 26-32.

(编辑:梁虹)